



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Pedro Adriano de Andrade Gois

**Envolvimento dos receptores purinérgicos periféricos e centrais na salivação
basal e induzida por pilocarpina em ratos**

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Pedro Adriano de Andrade Gois

Envolvimento dos receptores purinérgicos periféricos e centrais na salivação basal e induzida por pilocarpina em ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Patrícia Maria de Paula

Araraquara
2023

G616e Gois, Pedro Adriano de Andrade
 Envolvimento dos receptores purinérgicos periféricos e
 centrais na salivação basal e induzida por pilocarpina em ratos
 / Pedro Adriano de Andrade Gois. -- Araraquara, 2023
 41 f. : il., tabs., fotos

 Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia)
 - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
 Odontologia, Araraquara
 Orientadora: Patrícia Maria de Paula

 1. Trifosfato de Adenosina. 2. Receptores purinérgicos. 3.
 Pilocarpina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Pedro Adriano de Andrade Gois

**Envolvimento dos receptores purinérgicos periféricos e centrais na salivação
basal e induzida por pilocarpina em ratos**

Orientador: Prof (a) Dr (a) Patrícia Maria de Paula

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

A realização deste curso não teria sido possível sem a presença de diversas pessoas durante esta jornada, por este motivo agradeço:

À minha família que sempre estiveram presentes e me forneceram apoio durante todos os anos de graduação, sendo um pilar importante tanto na minha formação acadêmica como na formação do meu caráter e ser.

À minha professora e orientadora, por seus importantes ensinamentos e conselhos e por sempre ser uma pessoa iluminada, gentil, paciente e sobre tudo com um grande amor pelo o ensinar.

Aos diversos professores e funcionários que permitiram a realização deste curso e funcionamento da faculdade de odontologia de Araraquara.

Ao meus grandes amigos João Menezes, Luis Pardin, Nicolás Cortez e Vitor Lopez pelo companheirismo, amizade e pelas ajudas nos momentos mais difíceis do curso.

Aos meus colegas de turma pelo espírito confraternitário.

À agência de fomento CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento das bolsas de Iniciação Científica e recursos que possibilitaram a execução do projeto. Processos CNPq: 167541/2019-6, 121866/2020-3, 136402/2021-6, 134640/2022-5.

Gois PAA. Envolvimento dos receptores purinérgicos periféricos e centrais na salivação basal e induzida por pilocarpina em ratos [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

O trabalho experimental realizado tem como finalidade a investigação dos efeitos da injeção central e periférica de adenosina 5'-trifosfato (ATP) sobre a salivação, ingestão de água e alterações na temperatura corporal induzidas pela pilocarpina (PILO) também administrada intraperitonealmente. Foram utilizados ratos Holtzman (300-350g, n=99) e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Proc. nº 11/2019). Os resultados mostraram que a injeção ip de ATP (50 mg/kg, $31,5 \pm 6,3$ mg/10 min, vs. salina $43,2 \pm 8,3$ mg/10 min) e a injeção icv de ATP na dose (600 nmol/1 µl, $26,7 \pm 17,6$ mg/10 min, vs. salina $37,8 \pm 16,8$ mg/10 min) não alteraram a salivação basal. As injeções ip de ATP nas doses de 200 e 400 mg/kg de peso corporal reduziram a salivação induzida por PILO ($340,7 \pm 67,9$ mg/7 min, vs. salina: $630,4 \pm 52,2$ mg/7 min) e ($85,5 \pm 63,8$ mg/7 min, vs. salina: $540,5 \pm 44,5$ mg/7 min), respectivamente, porém as injeções intracerebroventricular (icv) de ATP nas doses de 100, 200, 600, 900 e 2000 nmol/1 µl não alteraram a salivação induzida por PILO ($449,9 \pm 51,9$ mg/7 min, vs. salina $464,6 \pm 82,2$ mg/7 min), ($267,3 \pm 68,2$ mg/7 min, vs. salina $274,9 \pm 53,6$ mg/7 min), ($420,4 \pm 95$ mg/7 min, vs. salina $432,8 \pm 64,3$ mg/7 min), ($527,3 \pm 82,6$ mg/7 min vs. salina $455,5 \pm 91,3$ mg/7 min) e ($726,1 \pm 40,3$ mg/7 min vs. salina $634,6 \pm 46,9$ mg/7 min) respectivamente. Outro grupo de 10 ratos recebeu injeção ip de PILO para a indução de ingestão de água. Dez minutos antes, metade do grupo recebeu injeção ip de ATP (200 mg/kg de peso corporal) ou salina. Em seguida foi oferecido água em buretas graduadas. Os resultados mostraram que as injeções ip de ATP (200 mg/kg) reduziram a ingestão de água induzida por PILO (salina + PILO: $2,2 \pm 0,56$ ml/15 min, vs. ATP + PILO: $0,16 \pm 0,14$ ml/15 min). Outro grupo de 8 ratos foram submetidos a uma laparotomia mediana para a colocação de sensores de temperatura corporal na cavidade abdominal. Os resultados mostraram que as injeções ip de ATP (200 mg/kg de peso corporal) não alteraram a temperatura corporal (salina + PILO: $0,3 \pm 0,1$ °C/18 min, vs. ATP + PILO: $0,15 \pm 0,1$ mg/18 min). Assim, os resultados sugerem que os receptores purinérgicos periféricos, mas não os centrais, participam da secreção salivar induzida por PILO e que a injeção periférica de ATP também reduz a ingestão de água induzida por PILO, mas não altera a temperatura corporal dos ratos.

Palavras – chave: Trifosfato de Adenosina. Receptores purinérgicos. Pilocarpina.

Gois PAA. Involvement of peripheral and central purinergic receptors in basal and pilocarpine-induced salivation in rats [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

The experimental work carried out aims to investigate the effects of central and peripheral injection of adenosine 5'-triphosphate (ATP) on salivation, water intake and changes in body temperature induced by pilocarpine (PILO) also administered intraperitoneally. Holtzman rats (300-350g, n=99) were used and the experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use - CEUA of the School of Dentistry of Araraquara (Proc. n° 11/2019). The results showed that the ip injection of ATP (50 mg/kg, 31.5 ± 6.3 mg/10 min, vs. saline 43.2 ± 8.3 mg/10 min) and the atp icv injection at the dose (600 nmol/1 μ l, 26.7 ± 17.6 mg/10 min, vs. saline 37.8 ± 16.8 mg/10 min) did not alter basal salivation. The ip injections of ATP at doses of 200 and 400 mg/kg body weight reduced PILO-induced salivation (340.7 ± 67.9 mg/7 min, vs. saline: 630.4 ± 52.2 mg/7 min) and (85.5 ± 63.8 mg/7 min, vs. saline: 540.5 ± 44.5 mg/7 min), respectively, but intracerebroventricular injections (icv) of ATP at doses of 100, 200, 600, 900 and 2000 nmol/1 μ l did not alter PILO-induced salivation (449.9 ± 51.9 mg/7 min, vs. saline 464.6 ± 82.2 mg/7 min), (267.3 ± 68.2 mg/7 min, vs. saline 274.9 ± 53.6 mg/7 min), (420.4 ± 95 mg/7 min, vs. saline 432.8 ± 64.3 mg/7 min), (527.3 ± 82.6 mg/7 min vs. saline 455.5 ± 91.3 mg/7 min) and (726.1 ± 40.3 mg/7 min vs. saline 634.6 ± 46.9 mg/7 min) respectively. Another group of 10 rats received ip injection of PILO for induction of water intake. Ten minutes earlier, half of the group received ip injection of ATP (200 mg/kg body weight) or saline. Water was then offered in graduated buras. The results showed that ip injections of ATP (200 mg/kg) reduced pilo-induced water intake (saline + PILO: 2.2 ± 0.56 ml/15 min, vs. ATP + PILO: 0.16 ± 0.14 ml/15 min). Another group of 8 rats were submitted to a median laparotomy for the placement of body temperature sensors in the abdominal cavity. The results showed that the ip injections of ATP (200 mg/kg body weight) did not alter body temperature (saline + PILO: 0.3 ± 0.1 °C/18 min, vs. ATP + PILO: 0.15 ± 0.1 mg/18 min). Thus, the results suggest that peripheral purinergic receptors, but not central ones, participate in PILO-induced salivary secretion and that peripheral ATP injection also reduces PILO-induced water intake, but does not alter the body temperature of rats.

Keywords: Adenosine Triphosphate. Receptors, purinergic. Pilocarpine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	12
3 REVISÃO DA LITERATURA	13
4 MATERIAL E MÉTODO.....	15
4.1 Animais	15
4.2 Cirurgia estereotaxica para implantes de cânulas de aço inoxidável nos Ventrículos Laterais (VL)	15
4.3 Injeção cerebral	16
4.4 Coleta de saliva	16
4.5 Ingestão de água	16
4.6 Medidas de temperatura corporal	16
4.7 Soluções e drogas	17
4.8 Histologia	17
4.9 Análise estatística	18
5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	19
5.1 Efeito da injeção periférica e central de ATP na salivação basal	19
5.2 Efeito da injeção periférica e central de ATP na salivação induzida por pilocarpina.....	19
5.3 Efeitos da injeção periférica de ATP na ingestão de água induzida por pilocarpina ip.....	19
5.4 Efeitos da injeção periférica de ATP nas alterações de temperatura corporal induzida por pilocarpina ip	20
6 RESULTADOS.....	21
6.1 Efeito da injeção periférica e central de ATP na salivação basal	21
6.2 Efeito da injeção periférica e central de ATP na salivação induzida por pilocarpina.....	22
6.3 Efeitos da injeção periférica de ATP na ingestão de água induzida por pilocarpina ip.....	30
6.4 Efeitos da injeção periférica de ATP nas alterações de temperatura corporal induzida por pilocarpina ip	31
7 DISCUSSÃO	33
8 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	36
ANEXO A	40
ANEXO B	41

1 INTRODUÇÃO

A salivação desempenha importantes funções na cavidade oral e sua falta acarreta diversos tipos de problemas como boca seca, queimaduras e infecções da mucosa oral, dificuldade de alimentação, desconforto ao falar, aumento do índice de cáries e doenças periodontais¹. A correção ou redução desses problemas com o uso de substâncias que estimulam a secreção salivar como a pilocarpina (PILO, agonista colinérgico muscarínico não específico) tem, portanto, muito interesse clínico¹.

O sistema nervoso autônomo controla a salivação. A ativação do sistema nervoso simpático causa vasoconstrição nas glândulas, aumento de secreção pelas células acinares e contração das células mioepiteliais, produzindo pouco volume salivar, mas com alta quantidade de proteína^{2,3}. A ativação da inervação parassimpática por sua vez promove a vasodilatação nas glândulas, promovendo uma secreção aquosa em grande quantidade e pobre em proteínas pelas células acinares e contração das células mioepiteliais²⁻⁴. Estudos da década de 80 demonstraram que mesmo após o bloqueio simpático e parassimpático há a continuação da salivação, demonstrando assim uma inervação não-adrenérgica e não-colinérgica (NANC)⁵. Estudos realizados por Gallacher⁶ (1982), apontou em glândulas salivares isoladas que o ATP (adenosina 5'-trifosfato) extracelular aumenta fluxo salivar, sugerindo o envolvimento da neurotransmissão purinérgica no controle da salivação.

A neurotransmissão purinérgica, onde o ATP e a adenosina são as principais substâncias ativas, foi introduzido por Burnstock⁷ em 1972. O ATP é uma purina extracelular envolvida em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores chamados purinérgicos⁸⁻¹². Os receptores purinérgicos foram primeiramente divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock¹³ (1978) em 2 classes: P1 e P2. De acordo com esta classificação os receptores P1 são exclusivos para a adenosina e são subdivididos em 4 tipos: A1, A2a, A2b e A3, estando todos acoplados à proteína G e são dependentes de adenilciclase. Além disso, eles são antagonizados por metilxantinas e seus derivados. Os receptores P2 são exclusivos para o ATP e são subdivididos em 2 tipos: P2X e P2Y. Nos mamíferos, os receptores P2X são subdivididos em 7 tipos: (P2X1 a P2X7) e são dependentes de canais iônicos (ionotrópicos, permeáveis aos íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺). Os P2Y são subdivididos em 8 tipos: (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e

P2Y₁₄), são acoplados a proteína G e operam via inositol trifosfato^{8,14}. O ATP é o agonista natural para os receptores P2.

Recentemente vários estudos têm demonstrado que o ATP extracelular, atuando nos receptores P2, está envolvido em vários mecanismos centrais de regulação cardiovascular, respiratória e da temperatura corporal¹⁵⁻²³. Adicionalmente, existem evidências de que o ATP está envolvido com o aumento da secreção salivar em glândulas isoladas^{6,24-26}. Por outro lado, trabalhos de Nakamoto et al.²⁷ (2009) mostraram que a secreção salivar da glândula submandibular induzida por administração de carbacol (agonista colinérgico muscarínico) foi inibida por ATP na glândula isolada, sugerindo um papel inibitório do ATP sobre a salivação induzida por ativação colinérgica. Desta forma, os trabalhos demonstram que o ATP está envolvido com o controle da secreção salivar, no entanto todos os estudos foram feitos em glândulas isoladas^{6,24-26}.

A pilocarpina (PILO), um agonista colinérgico muscarínico, inicialmente extraído da planta brasileira *Pilocarpus jaborandi*, age sobre as glândulas salivares e sudoríparas, produzindo salivação e sudorese¹. Embora a PILO possa atuar em receptores colinérgicos muscarínicos das glândulas salivares, estimulando a secreção salivar, estudos do nosso laboratório têm demonstrado que grande parte da salivação induzida pela injeção, mesmo periférica, de pilocarpina depende de mecanismos cerebrais e pode ser inibida pela lesão de estruturas cerebrais como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), área septal (AS) ou hipotálamo lateral (HL)²⁸. A injeção intracerebroventricular (icv) de PILO também produz intensa salivação em ratos, e essa salivação também pode ser abolida pela lesão da região AV3V, AS ou HL²⁸.

Sabendo que a noradrenalina é co-liberada com ATP em muitas sinapses do sistema nervoso central (SNC) e periférico^{13,29} e que as glândulas salivares possuem receptores purinérgicos^{6,24-26}, nossa hipótese é que os receptores purinérgicos também tenham uma modulação inibitória sobre a salivação induzida por PILO.

Vários estudos também mostraram que além da salivação, a PILO induz ingestão de água³⁰⁻³² e essa resposta depende da ação central e periférica da PILO³³. Assim, um dos objetivos desse trabalho foi investigar se os receptores purinérgicos (através da injeção do agonista natural destes receptores, o ATP) estão envolvidos nos mecanismos que controlam a ingestão de água e temperatura, além da salivação induzida por PILO.

Outro aspecto que será explorado em nesse trabalho são as alterações na temperatura corporal induzida por PILO. Nos ratos, um dos principais mecanismos de perda de calor é o espalhamento de saliva pela superfície corporal³⁴ e a PILO induz salivação nos ratos³². Estudos da literatura mostraram que injeção periférica de cevimelina (agonista colinérgico muscarínico) promove queda na temperatura corporal, porém a injeção periférica de PILO não alterou a temperatura corporal³⁵. No entanto, a dose de PILO utilizada (0,4 mg/kg) nos estudos de Omori et al.³⁵ (2003), foi bem menor que a dose usada em nossos experimentos (1 mg/kg). Portanto, iremos investigar as alterações na temperatura corporal após a injeção de PILO e se os receptores purinérgicos estão envolvidos nesses mecanismos.

2 PROPOSIÇÃO

Em vista das evidências em glândulas salivares isoladas de que os receptores purinérgicos estão envolvidos nos mecanismos periféricos do controle da secreção salivar, o presente trabalho tem como objetivo principal investigar se a salivação basal e induzida por PILO (injetada intraperitonealmente) poderia ser modificada pela administração central [intracerebroventricular (icv)] e/ou periférica [intraperitoneal (ip)] de ATP (agonista natural dos receptores purinérgicos).

Também investigamos se a ingestão de água e as alterações na temperatura corporal induzida por PILO (injetada intraperitonealmente) pode ser modificada pela injeção periférica [intraperitoneal (ip)] de ATP.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A adenosina 5' -trifosfato (ATP) é bastante conhecida como importante fonte de energia celular, porém a partir da década de 70⁷ foi introduzida como neurotransmissora de diversos processos fisiológicos³⁶. Burnstock⁷ (1972), introduziu o conceito da neurotransmissão de nervos não colinérgicos e não adrenérgica (NANC), a neurotransmissão purinérgica. Essa neurotransmissão tem o ATP e a adenosina como principais substâncias ativas. O ATP é uma purina extracelular envolvida em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores chamados purinérgicos⁸⁻¹². Os receptores purinérgicos foram divididos em 2 classes: P1 e P2¹³.

Os receptores P1 possuem grande afinidade a adenosina, um produto da degradação metabólica do ATP, e os receptores P2 são ligantes a purinas e pirimidinas¹³. Evidências de receptores P2 em animais invertebrados apontam que o ATP é uma molécula de sinalização extracelular primitiva³⁷. Estudos posteriores apontam que o ATP pode ser co-liberado juntamente com a neurotransmissão adrenérgica e colinérgica em nervos periféricos e centrais¹³. A co-liberação de ATP em sinapses adrenérgicas e colinérgicas juntamente com a marcação de receptores purinérgicos em glândulas salivares e outros órgãos apontam importantes papéis e interações destes receptores com tecidos, funções fisiológicas e possíveis regulações do sistema nervoso simpático e parassimpático.

A xerostomia e a hipossalivação são condições fisiopatológicas que possui alta prevalência na população³⁸. A xerostomia é caracterizada como a sensação de boca seca enquanto a hipossalivação é em si a diminuição do fluxo salivar ou da diminuição da qualidade da saliva³⁸. Várias patologias, medicamentos e condições psicológicas podem provocar a diminuição do fluxo salivar³⁹. Um dos principais fármacos utilizados no tratamento da xerostomia, hipossalivação e diversas outras enfermidades é a PILO. A PILO é um alcaloide agonista colinérgico muscarínico ligante dos receptores M3⁴⁰. Como qualquer outro fármaco a PILO apresenta efeitos secundários e adversos, agindo principalmente na musculatura lisa, nos vasos sanguíneos e em glândulas⁴¹. Quando administrada periféricamente um dos efeitos secundários indesejados no tratamento da hipossalivação e da xerostomia é a mudança na temperatura corporal e aumento na ingestão de água⁴².

Assim, o principal objetivo deste trabalho é investigar se a salivação basal e induzida por PILO (injetada intraperitonealmente) poderia ser modificada pela

administração central [intracerebroventricular (icv)] e/ou periférica [intraperitoneal (ip)] de ATP (agonista natural dos receptores purinérgicos). Também investigamos se a ingestão de água e as alterações na temperatura corporal induzida por PILO (injetada intraperitonealmente) pode ser modificada pela injeção periférica [intraperitoneal (ip)] de ATP.

4 MATERIAL E MÉTODO

Os materiais e métodos foram organizados como descrito abaixo.

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman (n = 99), adultos, com peso entre 300 e 350 gramas, fornecidos pelo biotério do Câmpus de Araraquara UNESP. Os animais foram mantidos a uma temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12:12 h. Os animais tiveram livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados entre as 8:00 e 18:00 h no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), UNESP. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP (Proc. CEUA nº 11/2019).

4.2 Cirurgia estereotaxica para implantes de cânulas de aço inoxidável nos Ventrículos Laterais (VL)

Para o implante de cânulas cerebrais, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotaxico (modelo Kopf 900). Nos pontos de introdução da cânula de aço inoxidável foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro para implante da cânula (diâmetro de 10 x 0.7 mm e comprimento de 10 mm). As coordenadas para o implante da cânula no VL foram: AP = 0,3 mm posterior ao bregma; L = 1,5 mm da sutura sagital e V = 4,0 mm abaixo da superfície do crânio⁴³. A cânula foi fixada à superfície do crânio por meio de acrílico autopolimerizável preso a dois parafusos no crânio. Um mandril foi mantido dentro da cânula para prevenir oclusão da cânula e infecção. O procedimento cirúrgico não excedeu 40 min. Após a cirurgia, os animais foram prontamente tratados com 50.000 UI de benzil-penicilina (injeção intramuscular) para prevenir infecções.

4.3 Injeção cerebral

As injeções no ventrículo lateral (VL, intracerebroventricular, icv) foram feitas com uma seringa Hamilton (10 µl) conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE 10), a uma cânula injetora de aço inoxidável com 12 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro. As drogas foram dissolvidas em salina fisiológica. O volume injetado no VL foi de 1 µl.

4.4 Coleta de saliva

Os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal). A saliva foi coletada e teve seu peso determinado com o auxílio de pequenas bolas de algodão previamente pesadas e colocadas nas porções laterais e dorso-pósterolinguais. A coleta da saliva foi realizada durante 7 minutos, iniciando-se 10 minutos após a injeção de pilocarpina (salivação induzida por PILO), ou realizada por 10 minutos, iniciando-se 10 minutos após a injeção de ATP ou salina (salivação basal).

4.5 Ingestão de água

Nos dias de teste, a ração foi removida das gaiolas. A ingestão de água foi registrada a cada 15 min durante 2 h, começando imediatamente após a injeção i.p. de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal), utilizando buretas com divisões de 0,1 mL. ATP ou veículo (salina) foram injetados ip 15 minutos antes da PILO. No primeiro teste, metade dos animais receberam solução salina + PILO e a outra metade o ATP + PILO. No teste seguinte, usando os mesmos animais, o mesmo protocolo foi executado em um design contrabalançado. Ao final dos dois testes, todos os animais do grupo receberam os dois tratamentos.

4.6 Medidas de temperatura corporal

Um dia antes dos experimentos, sob a anestesia com cloridrato de cetamina (80 mg/kg) combinada com xilazina (7 mg/kg) ip, foi colocada na cavidade abdominal dos ratos, através de uma laparotomia mediana, um sensor e registrador de temperatura corporal integrado (SubCue Data Logger, Calgary, Canadá). Os

sensores foram programados para coletar os dados de temperatura corporal a cada 6 min.

4.7 Soluções e drogas

O ATP ou seu veículo (salina) foram injetados centralmente [intracerebroventricular (icv)] ou periféricamente [intraperitonealmente (ip)]. A PILO foi injetada periféricamente [intraperitoneal (ip)].

Solução salina (NaCl 0,9% - veículo), injeção icv;

Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA): agonista colinérgico muscarínico, 1 mg/kg de peso corporal, injeção ip.

Adenosine 5'-triphosphate (ATP, Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA): agonista natural dos receptores P2 purinérgicos. Foi injetado nas seguintes doses:

Para salivação BASAL: 50 mg/kg, injeção ip; 600 nmol/1 µl, injeção icv;

Para salivação INDUZIDA POR PILOCARPINA: 200 e 400 mg/kg, injeções ip 100, 200, 600, 900 e 2000 nmol/1 µl, injeções icv;

Para INGESTÃO DE ÁGUA e MEDIDA DE TEMPERATURA: 200 mg/kg, injeção ip.

O agonista purinérgicos, ATP foi injetado de forma contrabalanceada, ao acaso, ou seja, para um mesmo grupo de animais; no primeiro experimento, metade dos animais receberam injeção de salina + PILO e a outra metade dos animais receberam injeção de ATP + PILO. No experimento seguinte, nos mesmos animais, o protocolo foi invertido.

4.8 Histologia

Ao final dos experimentos foi injetado 1 µl de solução 2% de azul de Evans para confirmar o sítio de microinjeção no VL. Os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental de sódio (60 mg/kg de peso corporal) e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração (ventrículo esquerdo) de solução salina tamponada (50 ml), seguida de solução de formalina 10% (50 ml). Em seguida, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% por 7 dias. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção no VL com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram

corados pelo método Giemsa. A análise microscópica da localização do sítio de microinjeção foi feita em microscópio óptico. Somente os animais com confirmação histológica positiva, ou seja, com microinjeção correta no VL foram utilizados para a análise estatística dos dados.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram tabelados e representados em gráficos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Teste-t de Student foi usado para comparação entre as médias. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

A organização dos protocolos experimentais é descrita abaixo

5.1 Efeito da injeção periférica e central de ATP na salivação basal

Para investigar os efeitos da injeção periférica de ATP na salivação basal foi injetado ATP (50 mg/kg) ou salina (veículo/controle) perifericamente (injeção intraperitoneal, ip) e após 10 minutos iniciou-se a coleta de saliva, que durou 10 minutos.

Para investigar os efeitos da injeção central de ATP na salivação basal foi injetado ATP 600 nmol/1 µl ou salina (veículo/controle) centralmente (injeção no VL ou intracerebroventricular, icv) e após 10 minutos iniciou-se a coleta de saliva, que durou 10 minutos.

5.2 Efeito da injeção periférica e central de ATP na salivação induzida por pilocarpina

Para investigar os efeitos da injeção periférica de ATP na salivação induzida por PILO, foi injetado ATP (200 e 400 mg/kg) ou salina (veículo/controle) perifericamente (injeção intraperitoneal, ip) e após 10 minutos foi injetado pilocarpina (1 mg/kg, ip). A coleta de saliva iniciou-se 10 minutos após a injeção de PILO e foi realizada durante 7 minutos.

Para investigar os efeitos da injeção central de ATP na salivação induzida por PILO, foi injetado ATP (100, 200, 600, 900 e 2000 nmol/1 µl) ou salina (veículo/controle) centralmente (injeção no VL ou intracerebroventricular, icv) e após 10 minutos foi injetado PILO (1 mg/kg, ip). A coleta de saliva iniciou-se 10 minutos após a injeção de PILO e foi realizada durante 7 minutos.

5.3 Efeitos da injeção periférica de ATP na ingestão de água induzida por pilocarpina ip

Para investigar os efeitos periféricos do ATP na ingestão de água induzida por PILO, foi injetado ATP (200 mg/kg) ou salina (veículo/controle) intraperitonealmente e após 10 minutos foi injetado PILO (1 mg/kg, ip). A ingestão de água foi registrada a

cada 15 minutos durante 1 hora, começando imediatamente após a injeção ip de PILO.

5.4 Efeitos da injeção periférica de ATP nas alterações de temperatura corporal induzida por pilocarpina ip

Para investigar os efeitos periféricos do ATP nas alterações de temperatura corporal induzida por PILO, foi injetado ATP (200 mg/kg) ou salina (veículo/controle) intraperitonealmente e após 10 minutos foi injetado PILO (1 mg/kg, ip). A temperatura corporal foi registrada a cada 6 min, num período de 1 hora após as injeções.

6 RESULTADOS

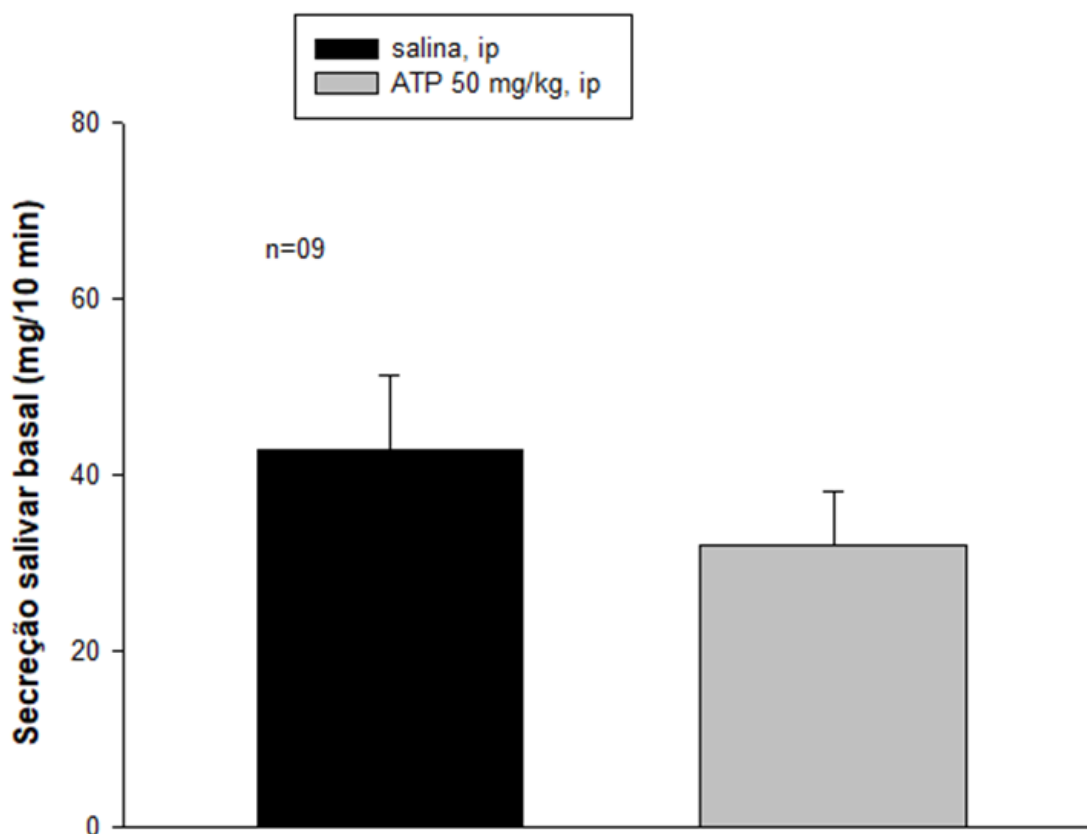
Os resultados estão demonstrados abaixo.

6.1 Efeito da injeção periférica e central de ATP na salivação basal

A injeção ip de ATP na dose de 50 mg/kg não alterou a salivação basal ($31,5 \pm 6,3$ mg/10 min, vs. salina: $43,2 \pm 8,3$ mg/10 min, figura 1).

A injeção icv de ATP na dose de 600 nmol/1 μ l também não alterou salivação basal ($26,7 \pm 17,6$ mg/10 min, vs. salina: $37,8 \pm 16,8$ mg/10 min, figura 2).

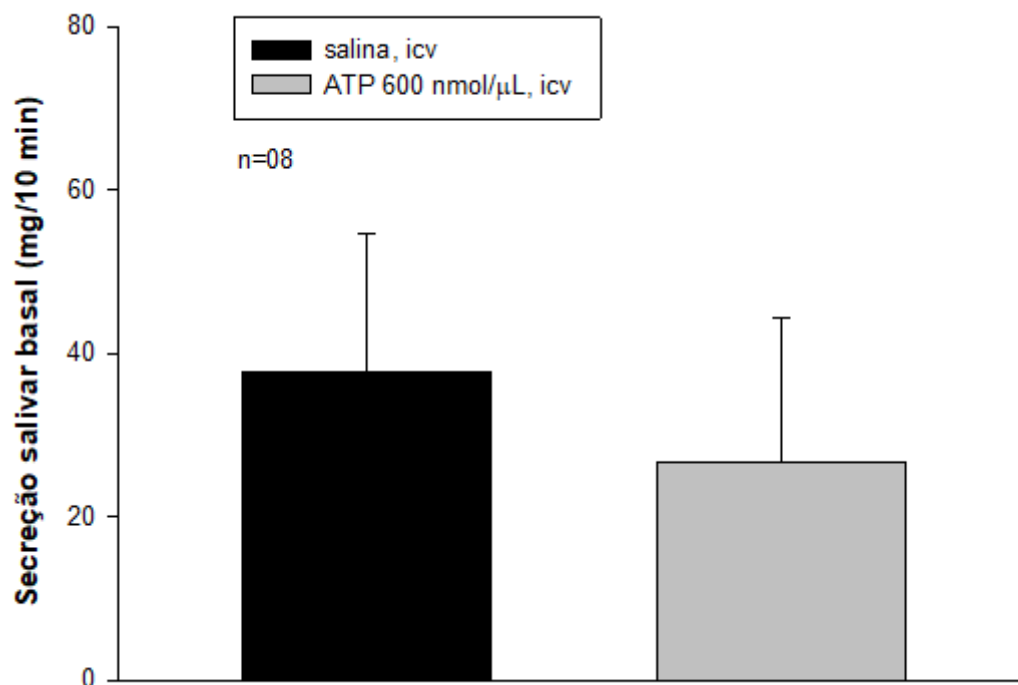
Figura 01 - Secreção salivar basal. ATP 50mg/kg, ip



Secreção salivar basal (mg/10 min) em ratos que receberam injeção periférica (intraperitoneal, ip) de salina ou ATP (50 mg/kg). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 02 - Secreção salivar basal. ATP 600 nmol/1 µl, icv



Secreção salivar basal (mg/10 min) em ratos que receberam injeção central [intracerebroventricular (icv)] de salina ou ATP (600 nmol/1 µl). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais.

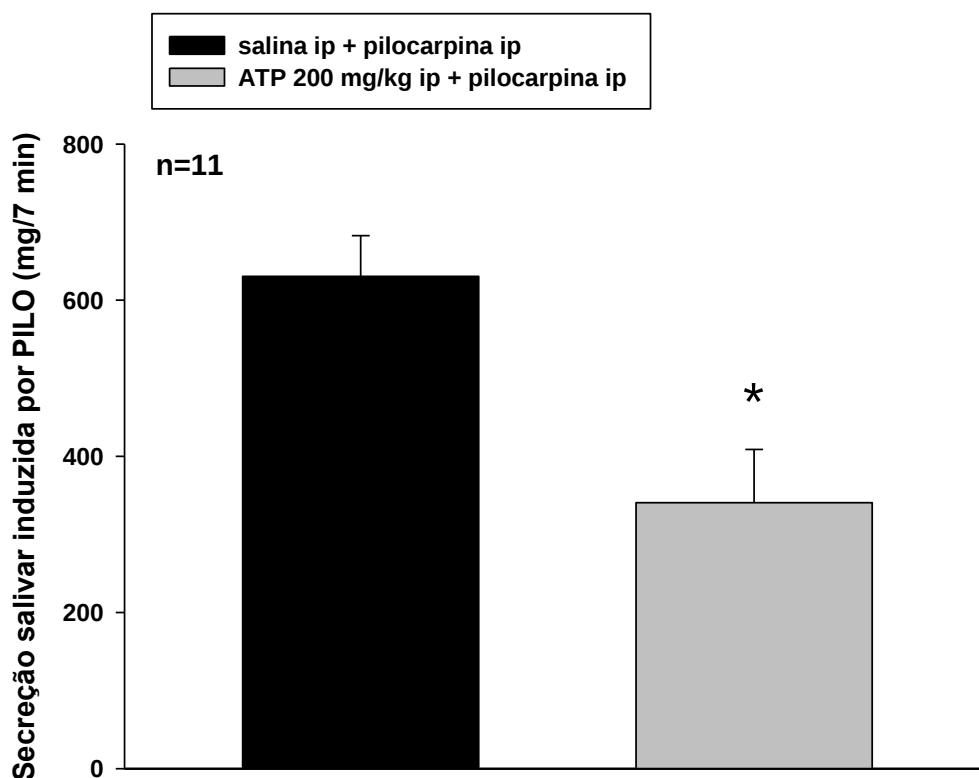
Fonte: Elaboração própria

6.2 Efeito da injeção periférica e central de ATP na salivação induzida por pilocarpina

As injeções ip de ATP nas doses de 200 e 400 mg/kg reduziram a salivação induzida por PILO ($340,7 \pm 67,9$ mg/7 min, vs. salina: $630,4 \pm 52,2$ mg/7 min, figura 3) e ($85,5 \pm 63,8$ mg/7 min, vs. salina: $540,5 \pm 44,5$ mg/7 min, figura 4), respectivamente. Entretanto, as injeções centrais (icv) de ATP nas doses de 100, 200, 600, 900 e 2000 nmol/1 µl não alteraram a salivação induzida por PILO ($449,9 \pm 51,9$ mg/7 min, vs. salina: $464,6 \pm 82,2$ mg/7 min, figura 5), ($267,3 \pm 68,2$ mg/7 min, vs. salina: $274,9 \pm 53,6$ mg/7 min, figura 6), ($420,4 \pm 95$ mg/7 min, vs. salina: $432,8 \pm 64,3$ mg/7 min, figura 7), ($527,3 \pm 82,6$ mg/7 min, vs. salina: $455,5 \pm 91,3$ mg/7 min, figura 8) e ($726,1 \pm 40,3$ mg/7 min, vs. salina: $634,6 \pm 46,9$ mg/7 min, figura 9), respectivamente.

A figura 10 apresenta uma fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um rato representativo dos grupos que receberam injeção icv, mostrando (seta) o local de injeção no ventrículo lateral (VL).

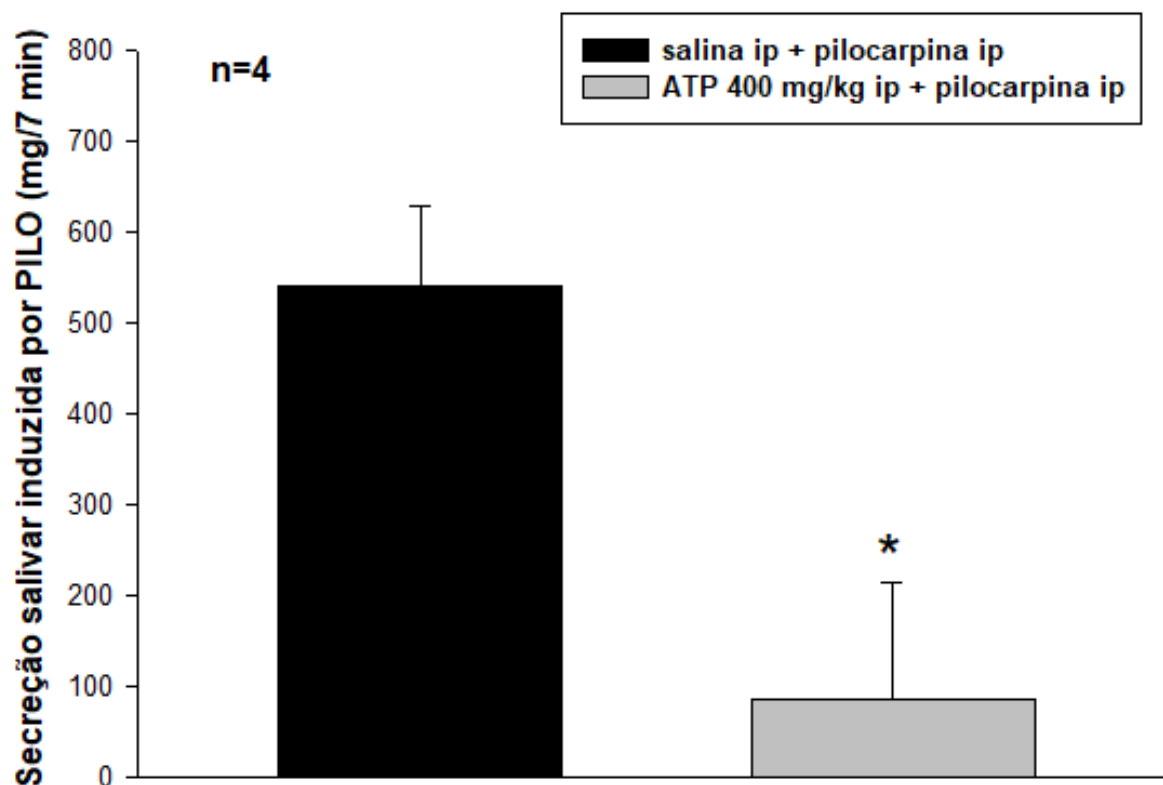
Figura 03 - Secreção salivar induzida por PILO. ATP 200mg/kg, ip



Secreção salivar (mg/7 min) induzida por injeção intraperitoneal de PILO (1mg/Kg) em ratos que receberam injeção periférica (ip) de salina ou ATP (200 mg/kg). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

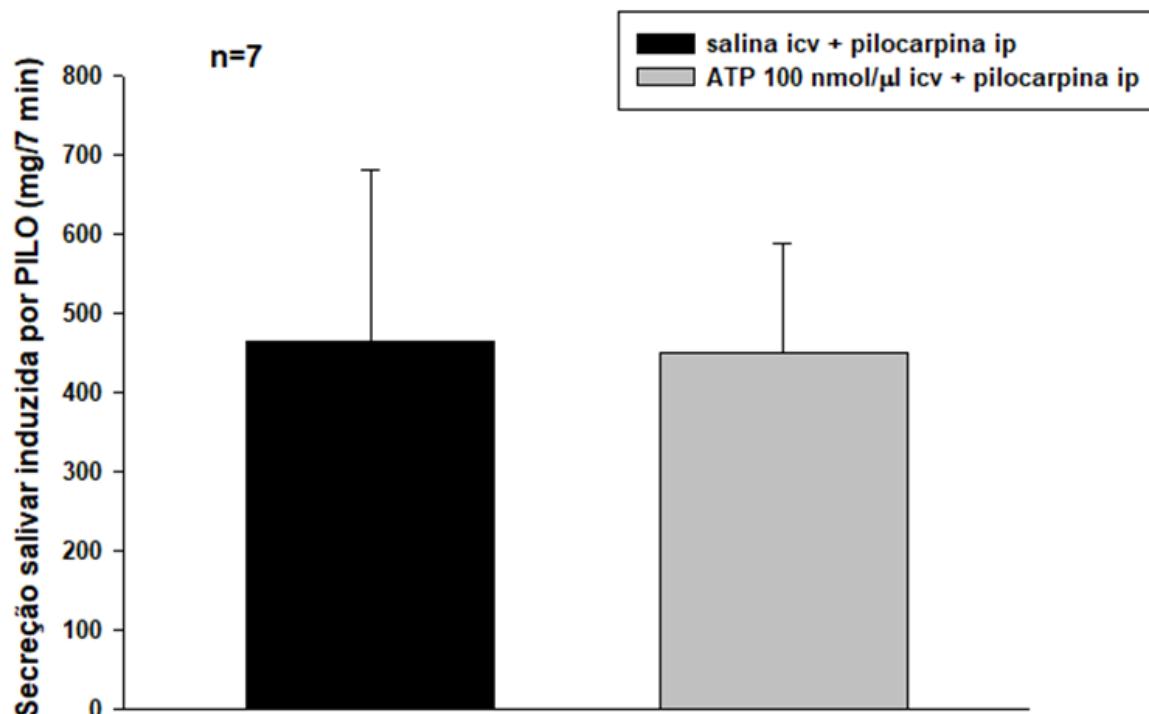
Figura 04 - Secreção salivar induzida por PILO. ATP 400mg/kg, ip



Secreção salivar (mg/7 min) induzida por injeção intraperitoneal de PILO (1mg/Kg) em ratos que receberam injeção periférica (ip) de salina ou ATP (400 mg/kg). Resultados são expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

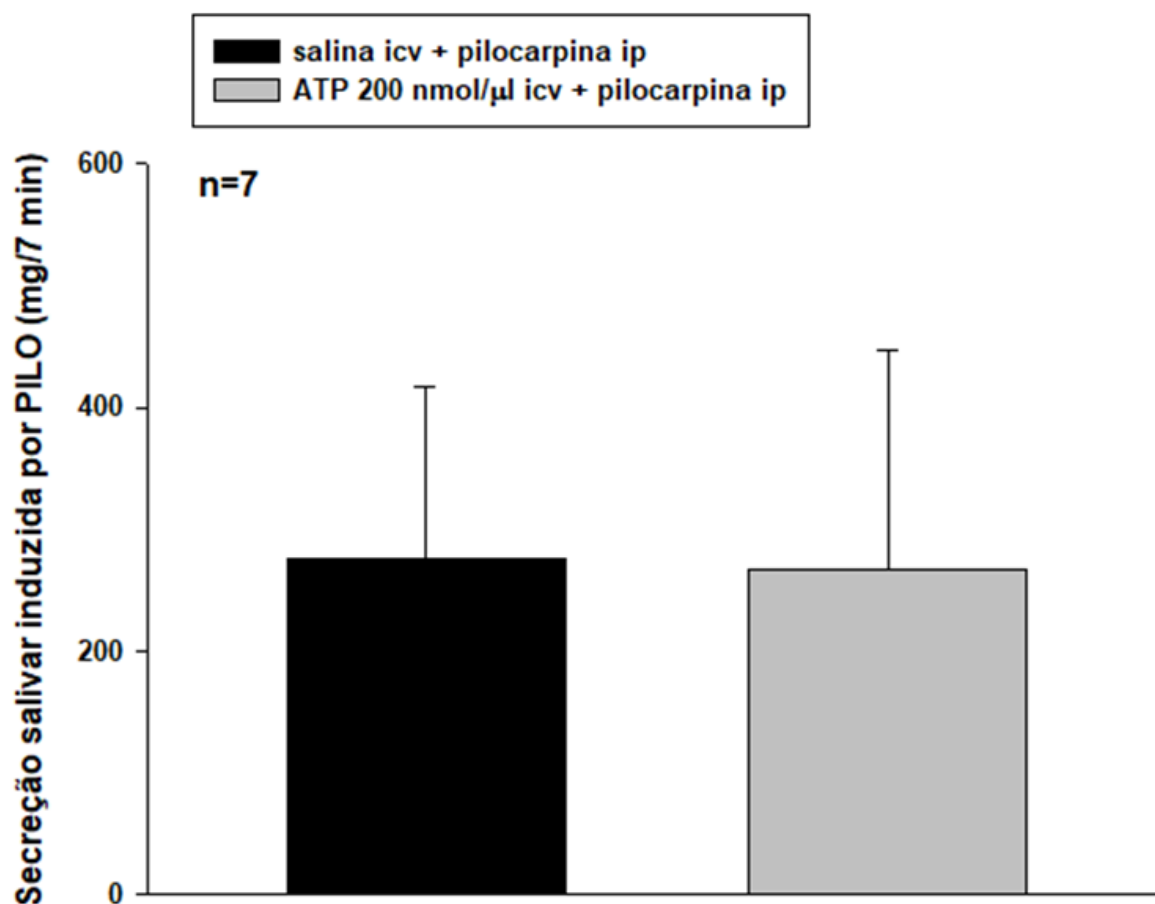
Figura 05 - Secreção salivar induzida por PILO. ATP 100nmol/ 1 µl, icv



Secreção salivar (mg/7 min) induzida por injeção intraperitoneal (ip) de PILO (1 mg/Kg) em ratos que receberam injeção intracerebroventricular (icv) de salina ou ATP (100 nmol/µL). Resultados são expressos como média + EPM. n = número de animais.

Fonte: Elaboração própria.

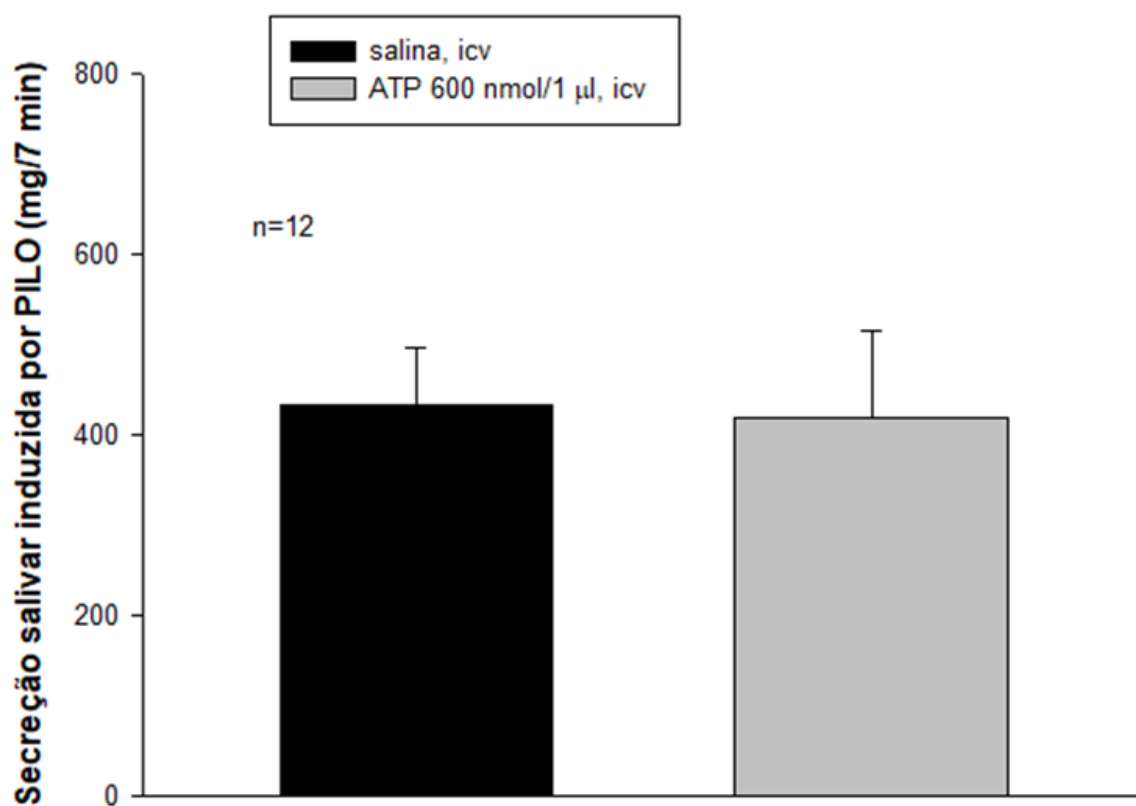
Figura 06 - Secreção salivar induzida por PILO. ATP 200nmol/ 1 µl, icv



Secreção salivar (mg/7 min) induzida por injeção intraperitoneal (ip) de PILO (1 mg/Kg) em ratos que receberam injeção intracerebroventricular (icv) de salina ou ATP (200 nmol/µL). Resultados são expressos como média + EPM. n = número de animais.

Fonte: Elaboração própria.

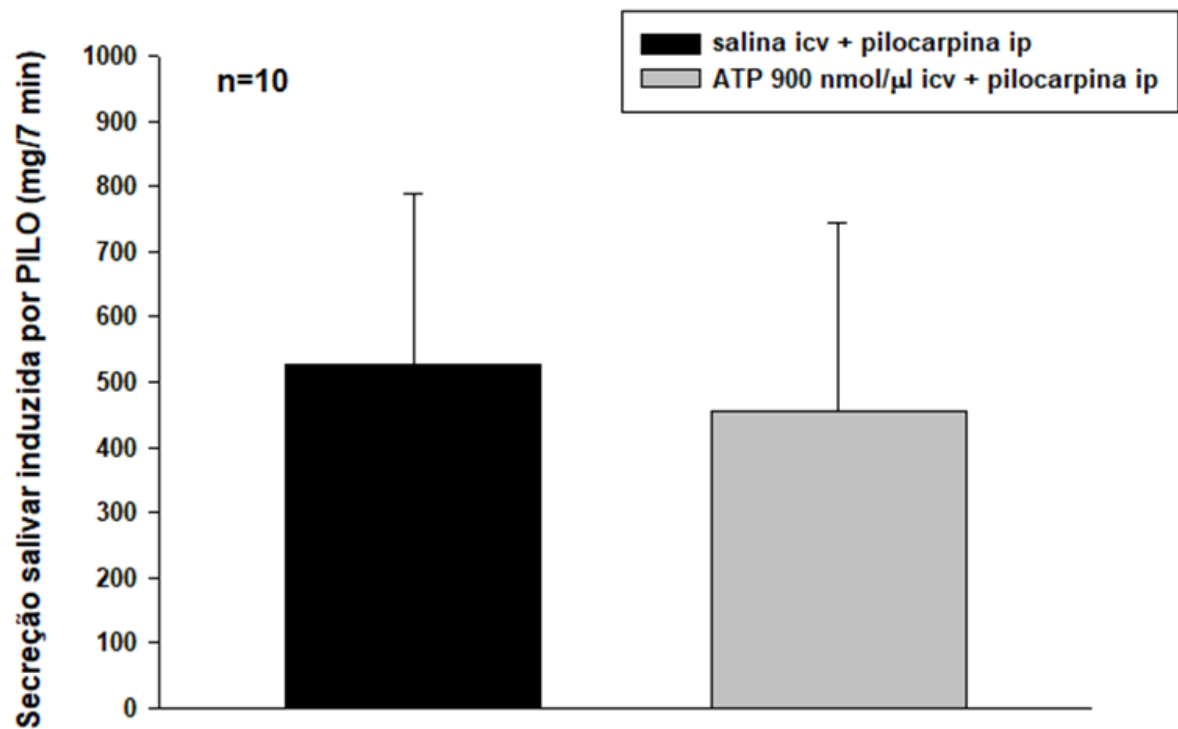
Figura 07 - Secreção salivar induzida por PILO. ATP 600nmol/ 1 μ l, icv



Secreção salivar (mg/7 min) induzida por injeção intraperitoneal (ip) de PILO (1 mg/Kg) em ratos que receberam injeção intracerebroventricular (icv) de salina ou ATP (600 nmol/ μ L). Resultados são expressos como média + EPM. n = número de animais.

Fonte: Elaboração própria.

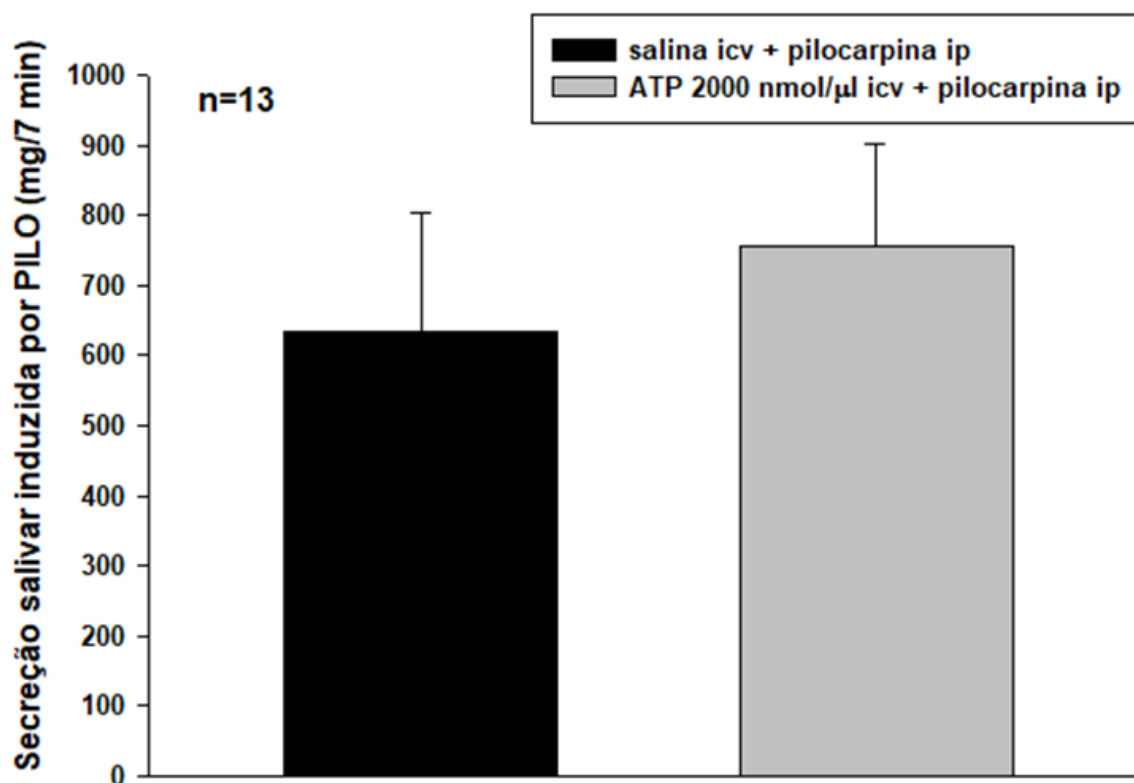
Figura 08 - Secreção salivar induzida por PILO. ATP 900nmol/ 1 μ l, icv



Secreção salivar (mg/7 min) induzida por injeção intraperitoneal (ip) de PILO (1 mg/Kg) em ratos que receberam injeção intracerebroventricular (icv) de salina ou ATP (900 nmol/ μ L). Resultados são expressos como média + EPM. n = número de animais.

Fonte: Elaboração própria.

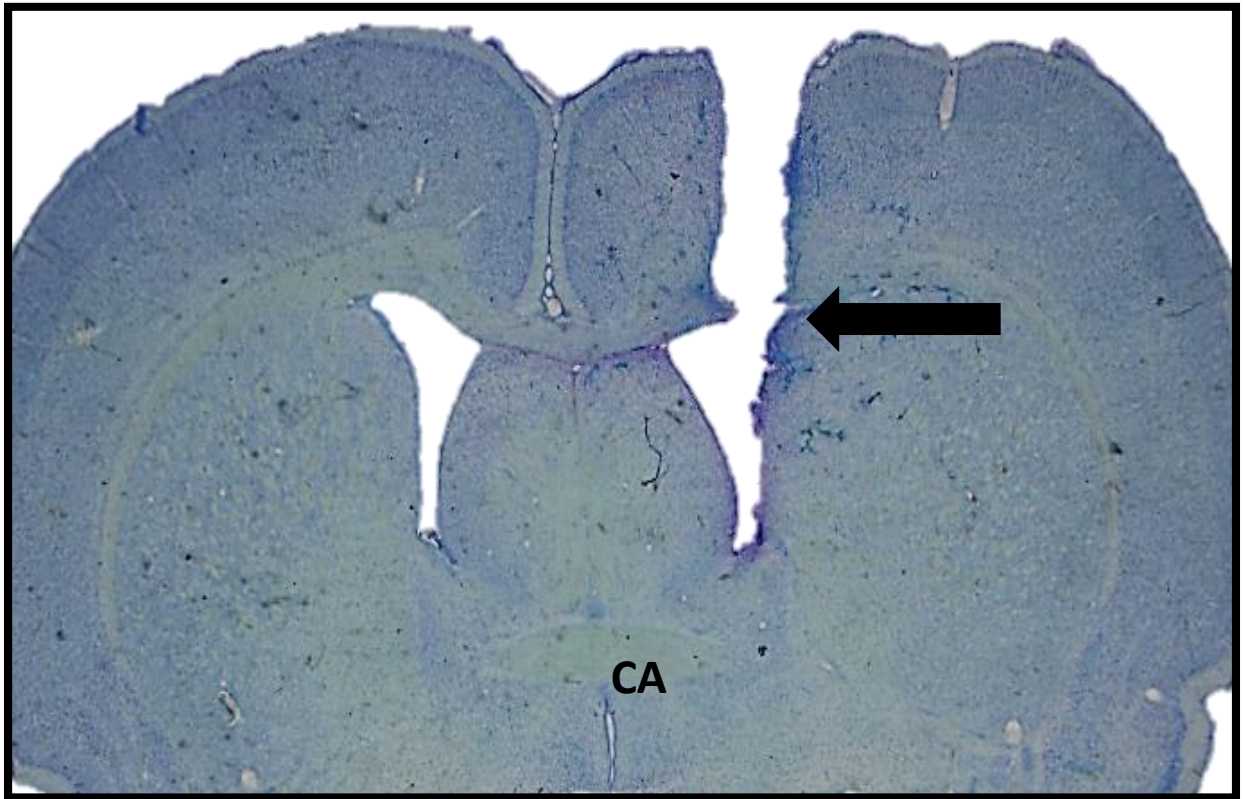
Figura 09 - Secreção salivar induzida por PILO. ATP 2000nmol/ 1 µl, icv



Secreção salivar (mg/7 min) induzida por injeção intraperitoneal (ip) de PILO (1 mg/Kg) em ratos que receberam injeção intracerebroventricular (icv) de salina ou ATP (2000 nmol/µL). Resultados são expressos como média + EPM. n = número de animais.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 - Fotomicrografia mostrando o sítio de injeção no ventrículo lateral (VL, seta)



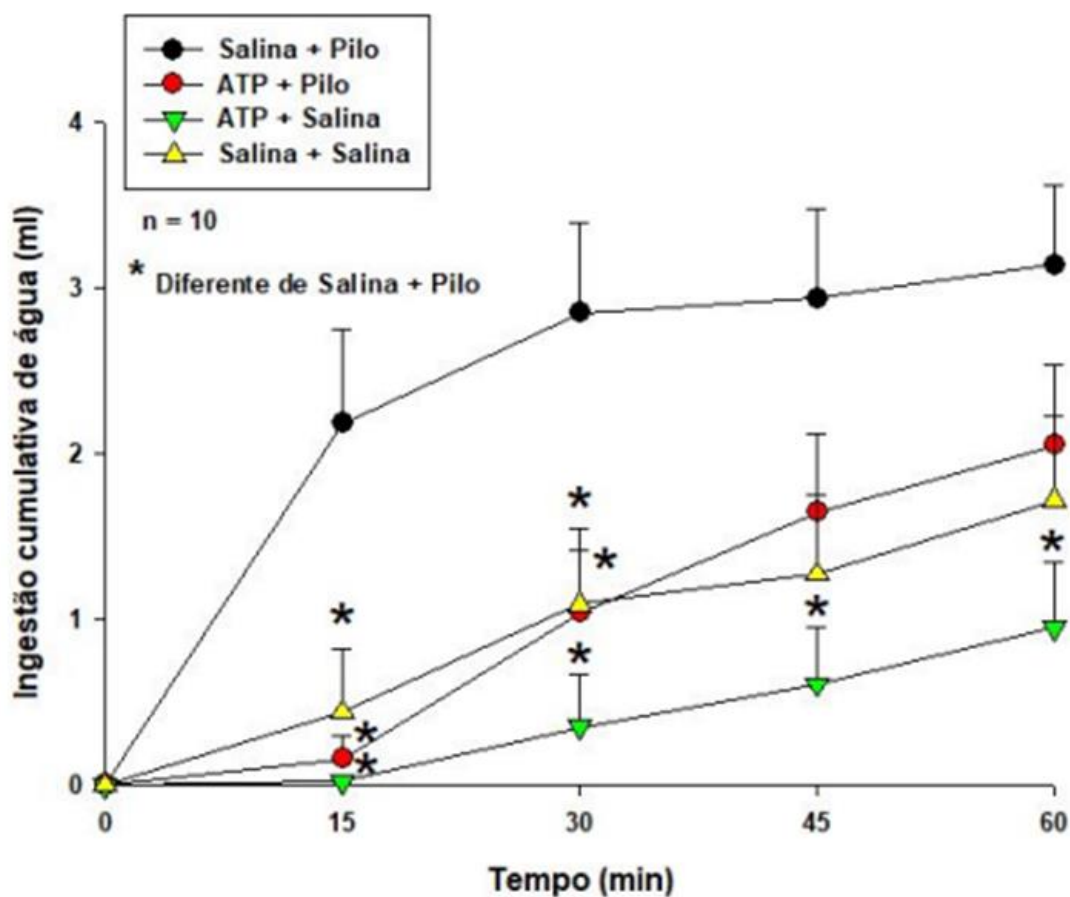
CA, comissura anterior.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6.3 Efeitos da injeção periférica de ATP na ingestão de água induzida por pilocarpina ip

A injeção periférica ou intraperitoneal (ip) de ATP na dose de 200 mg/kg reduziu a ingestão de água induzida por PILO (salina + PILO: $2,2 \pm 0,56$ ml/15 min, vs. ATP + PILO: $0,16 \pm 0,14$ ml/15 min, figura 11).

Figura 11 – Ingestão cumulativa de água induzida por PILO. ATP 200mg/kg, ip



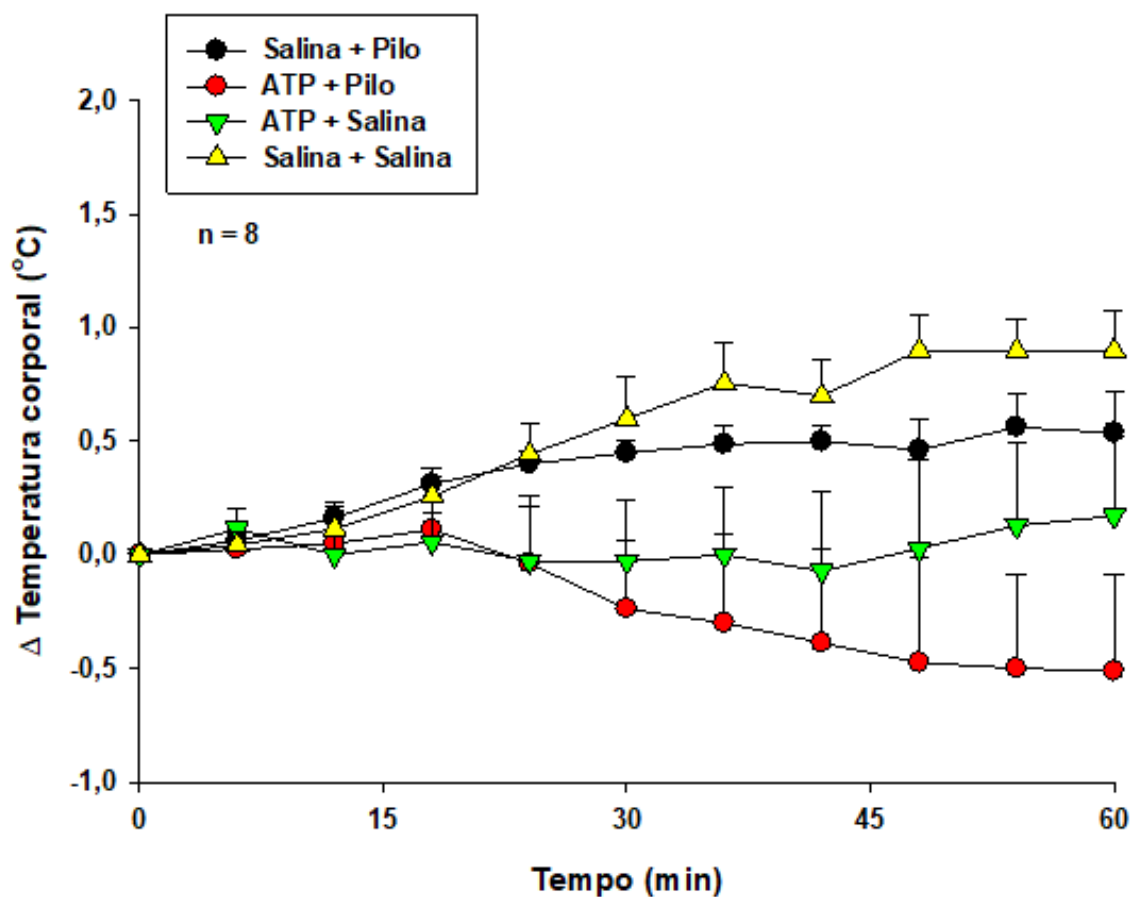
Ingestão cumulativa de água induzida por injeção ip de PILO (1mg/kg) em ratos que receberam injeção ip de salina ou ATP (200 mg/kg). Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM, n, número de animais. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

6.4 Efeitos da injeção periférica de ATP nas alterações de temperatura corporal induzida por pilocarpina ip

A injeção periférica ou intraperitoneal (ip) de ATP na dose de 200 mg/kg e a injeção ip de PILO 1 mg/kg não alteraram a temperatura corporal (salina + PILO: $0,3 \pm 0,1$ °C/18 min, vs. ATP + PILO: $0,15 \pm 0,1$ mg/18 min, figura 12).

Figura 12 – Alterações da temperatura corporal induzida por PILO. ATP 200mg/kg, ip



Variação temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}/6$ min) em ratos que receberam injeção ip de PILO (1 mg/kg) e injeção ip de salina ou ATP (200 mg/kg). Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM, n, número de animais.

Fonte: Elaboração própria.

7 DISCUSSÃO

Os resultados mostram que as injeções periféricas (ip) de ATP reduziram a ingestão de água, salivação basal e a salivação induzida por pilocarpina enquanto as injeções icv de ATP não alteraram esta salivação. A administração periférica de ATP não influenciou mudanças na temperatura corporal. Assim, os resultados sugerem que os receptores purinérgicos periféricos (possivelmente presentes nas glândulas salivares), mas não os centrais, participam da ingestão de água e da secreção salivar basal e induzida por pilocarpina.

Nossos resultados são inéditos em demonstrar o envolvimento da neurotransmissão purinérgica na salivação basal e induzida por PILO de animais intactos (inteiros) e também na ingestão de água induzida por PILO. No entanto, mais experimentos com outras doses de ATP e ingestão de água serão necessários para elucidar os mecanismos envolvidos neste processo, como por exemplo, se o ATP é co-liberado com outros neurotransmissores como a noradrenalina durante a secreção salivar e ingestão de água induzida por PILO.

Gallacher⁶ (1982) demonstrou pela primeira vez que glândulas salivares de camundongos apresentam receptores purinérgicos P2 e que o ATP extracelular está envolvido em processos secretórios nas células acinares e ductais. A ativação de receptores purinérgicos parece estimular a secreção salivar protéica^{6,25}, porém todos os estudos foram feitos em glândulas isoladas^{6,24-26}.

Com relação a salivação induzida por PILO, um agonista colinérgico muscarínico que age sobre as glândulas salivares produzindo salivação¹, estudos mais recentes de nosso laboratório têm demonstrado que grande parte da salivação induzida pela injeção periférica de pilocarpina depende de mecanismos cerebrais e pode ser inibida pela lesão de estruturas cerebrais como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), área septal (AS) ou hipotálamo lateral (HL)²⁸. A injeção icv de pilocarpina também produz intensa salivação em ratos, e essa salivação também pode ser abolida pela lesão da região AV3V, AS ou HL²⁸. Adicionalmente, outros estudos de nosso laboratório mostraram que agonistas adrenérgicos como a noradrenalina e moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos alfa2 e imidazólicos) injetadas centralmente ou perifericamente têm um papel inibitório na salivação induzida pela pilocarpina injetada intraperitonealmente (ip)^{44,45,32,46,47}

sugerindo uma participação de receptores adrenérgicos centrais na inibição da secreção salivar.

Os resultados deste estudo demonstraram que a injeção periférica (ip) de ATP na dose de 50 mg/kg de ATP reduziu a salivação basal e injeção periférica (ip) de ATP nas doses de 200 e 400 mg/kg reduziram a salivação induzida por PILO (1 mg/kg, ip). Porém, as injeções icv de ATP não alteraram a salivação basal e induzida por PILO. Também verificamos que a injeção ip de ATP na dose de 200 mg/kg reduziu a ingestão de água induzida por PILO, mas não alterou a temperatura corporal. O conjunto destes resultados sugere que a salivação e ingestão de água induzidas por PILO depende da ativação de receptores purinérgicos periféricos. Estes resultados estão de acordo com os achados de Nakamoto et al.²⁷ (2009), que demonstraram que a secreção salivar da glândula submandibular induzida por administração de carbacol (agonista colinérgico muscarínico) foi inibida por ATP na glândula isolada, sugerindo um papel inibitório do ATP sobre a salivação induzida por ativação colinérgica.

Em resumo, os resultados obtidos em animais inteiros e intactos mostram que os receptores purinérgicos periféricos, mas não os centrais, estão envolvidos nos mecanismos do controle da secreção salivar e ingestão de água induzida por PILO.

8 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a injeção periférica de ATP reduziu a salivação e a ingestão de água induzida por PILO ip, porém, a injeção periférica de ATP e PILO não alteraram a temperatura corporal de ratos.

REFERÊNCIAS*

1. Ferguson M. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 75(2): 186-91.
2. Garret JR. The proper role of nerves in salivary secretion. *J Dent Res.* 1987; 66(2): 387-97.
3. Bradley RM. Salivary secretion. In: Getchell TV, editor. *Smell and taste in health and disease.* New York: Raven Press; 1991. p. 127-44.
4. Izumi H, Karita K. Parasympathetic-mediated reflex salivation and vasodilatation in the cat submandibular gland. *Am J Physiol.* 1994; 267(3 Pt 2): 747-53.
5. Ekström J, Månsson B, Olgart L, Tobin G. Non-adrenergic, noncholinergic salivary secretion in the ferret. *Q J Exp Physiol.* 1988; 73(2): 163-73.
6. Gallacher DV. Are there purinergic receptors on parotid acinar cells? *Nature.* 1982; 296(5852): 83-6.
7. Burnstock G: Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24. 1972; 24(3): 509-81.
8. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50(3): 413-92.
9. Fredholm BB. Adenosine receptors in the central nervous system. *NIPS.* 1995; 10: 122-8.
10. Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signaling molecules. *Neuropharmacology.* 1997; 36(9): 1127-39.
11. Kennedy C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. *J Auton Nerv System.* 2000; 81(1-3):158-63.
12. Fagura MS, Jarvis GE, Dougall IG, Leff P. Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. *J Auton Nerv System.* 2000; 81(1-3): 178-86.
13. Burnstock G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog Neurobiol.* 1978; 11: 205-22
14. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007; 87(2): 659-797.
15. Phillis JW, Scislo TJ, O'leary DS. Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24(9-10): 738-42.

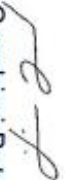
* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>.

16. Horiuchi J, Potts PD, Tagawa T, Dampney RA. Effects of activation and blockade of P2x receptors in the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity. *J Auton Nerv Syst.* 1999; 76(2-3): 118-26.
17. Ralevic V, Thomas T, Burnstock G, Spyer KM. Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience.* 1999; 94(3): 867-78.
18. Ralevic V. P2 receptors in the central and peripheral nervous systems modulating sympathetic vasomotor tone. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 81(1-3): 205-11.
19. Gourine AV, Melenchuk EV, Poputnikov DM, Gourine VN, Spyer KM. Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(8): 2047-55.
20. Paton JF, de Paula PM, Spyer KM, Machado BH, Boscan P. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J Physiol.* 2002; 543(Pt 3): 995-1005.
21. Gourine AV, Dale N, Gourine VN, Spyer, KM. Fever in systemic inflammation: roles of purines. *Front Biosci.* 2004; 9: 1011-22.
22. de Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am J Physiol.* 2004; 287(5): R1164-71.
23. Gourine AV, Poputnikov DM, Zhernosek N, Melenchuk EV, Gerstberger R, Spyer KM, Gourine VN. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. *Br J Pharmacol.* 2005; 146: 139-45.
24. Lee MG, Zeng W, Muallem S. Characterization and localization of P2 receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem.* 1997; 272: 32951-5.
25. Dehaye JP, Moran A, Marino A. Purines, a new class of agonists in salivary glands? *Arch Oral Biol.* 1999; 44 Suppl 1: S39-43.
26. Turner JT, Landon LA, Gibbons SJ, Talamo BR. Salivary gland P2 nucleotide receptors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(2): 210-24.
27. Nakamoto T, Brown DA, Catalán MA, Gonzalez-Begne M, Romanenko VG, Melvin JE. Purinergic P2X7 receptors mediate ATP-induced saliva secretion by the mouse submandibular gland. *J Biol Chem.* 2009; 284(8):4815-22.
28. Renzi A, Colombari E, Mattos Filho TR, Silveira JEN, Saad WA, Camargo LAA et al. Involvement of the central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats. *J Dent Res.* 1993; 72(11):1481-4
29. Burnstock G. Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurons. *Prog Brain.* 1986; 68: 193–203.

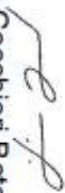
30. Gay PE, Benner SC, Leaf RC. Drinking induced by parenteral injections of pilocarpine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1976, 5(6):633-8.
31. Sanchez C, Meier E. Central and peripheral mediation of hypothermia, tremor and salivation induced by muscarinic agonists in mice. *Pharmacol Toxicol.* 1993, 72(4- 5):262-7.
32. Takakura ACT, Moreira TS, Laitano SC, de Luca Júnior, LA, Renzi A. Central muscarinic receptors on pilocarpine-induced salivation. *J Dental Res.* 2003, 82(12): 993-7.
33. Takakura ACT, Moreira TS, de Luca Júnior LA, Renzi A, Menani JV, Colombari E. Effects of AV3V lesion on pilocarpine-induced pressor response and salivary gland vasodilation. *Brain Res.* 2005, 1055(1-2):111-21.
34. Romanovsky AA. Thermoregulation: some concepts have changed: functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292(1): R37-46.
35. Omori Y, Asari T, Maruyama K, Kusama H, Kojima M, Shibata N. Effects of pilocarpine hydrochloride and cevimeline on submandibular/sublingual salivation in rat xerostomia model produced by X-ray irradiation. *Arzneimittelforschung.* 2003; 53(5): 342-50.
36. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* 2004; 240: 31–304.
37. Burnstock G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv.* 2018; 6; 2: 2398212818817494.
38. Nederfors T. Xerostomia and hyposalivation. *Adv Dent Res.* 2000; 14(1): 48-56.
39. Bergdahl M, Bergdahl J. Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression, and stress. *J Dent Res.* 2000; 79(9): 1652-8.
40. Treijtel N, Groenendaal-van de Meent D, Michon I, Korstanje C, Meijer J, Francke K et al. Pilocarpine-induced effects on salivary secretion as a pharmacological biomarker for cholinergic parasympathetic activation. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2022; 11(1): 25-33.
41. Pakala RS, Brown KN, Preuss CV. Cholinergic medications. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2022 [acesso em 10 jan 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538163/>.
42. Borella TL. Subtipos de receptores colinérgicos centrais envolvidos na salivação, ingestão de água e resposta pressora induzidas pela pilocarpina injetada periféricamente [Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas] São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2008.
43. Paxinos G, Watson C. The brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1998.

44. Moreira TS, Thomaz AC, de Luca Júnior LA, Renzi A, Menani JV. Moxonidine reduces pilocarpine-induced salivation in rats. *Auton Neurosci*. 2001; 91(1-2):32-6.
45. Moreira TS, Takakura AC, de Luca Júnior LA, Renzi A, Menani JV. Inhibition of pilocarpine-induced salivation in rats by central noradrenaline. *Arch Oral Biol*. 2002; 47(6): 429-34.
46. Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, de Luca Júnior LA, Renzi A, Menani JV. Central moxonidine on salivary gland blood flow and cardiovascular responses to pilocarpine. *Brain Res*. 2003; 987(2):155-63.
47. Takakura AC, Moreira TS, Colombari DS, de Luca Júnior LA, Menani JV. Activation of alpha(2)-adrenoceptors in the lateral hypothalamus reduces pilocarpine-induced salivation in rats. *Neurosci Lett*. 2009; 450(3): 225-8.

ANEXO A – CERTIFICADO 2021

	 unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"	
Certificado		
Certifico que Pedro Adriano de Andrade Gois, portador(a) do CPF número 441.006.268-94, desenvolveu a pesquisa "Envolvimento de receptores purinérgicos periféricos e centrais na salivção basal e induzida por pilocarpina em ratos" no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp, na modalidade Bolsa PIBIC CNPq, no período de 01/09/2020 a 31/08/2021, na(o) Faculdade de Odontologia de Araraquara da Unesp, sob a supervisão do(a) Professor(a) Patricia Maria de Paula.		
São Paulo, 24 de fevereiro de 2023		
 Edson Cocchieni Botelho Pró-Reitor de Pesquisa Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"		

ANEXO B – CERTIFICADO 2022

		
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"		
Certificado		
Certifico que Pedro Adriano de Andrade Gois, portador(a) do CPF número 441.006.268-94, desenvolveu a pesquisa "ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS NA SALIVAÇÃO, INGESTÃO DE ÁGUA E ALTERAÇÕES NA TEMPERATURA CORPORAL INDUZIDA POR PILOCARPINA EM RATOS" no âmbito do PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp, na modalidade Bolsa PIBIC CNPq, no período de 01/09/2021 a 31/08/2022, na(o) Faculdade de Odontologia de Araraquara da Unesp, sob a supervisão do(a) Professor(a) Patricia Maria de Paula.		
São Paulo, 24 de fevereiro de 2023		
 Edson Cocchieri Botelho Pró-Reitor de Pesquisa Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"		